

学位論文

齲蝕関連細菌の樹状細胞成熟に及ぼす影響について

高松 夏子

キーワード：齲蝕関連細菌, *S. mutans*, 樹状細胞, 血清, 唾液

Study on the Maturation of Dendritic Cells Induced by Bacteria in Carious Lesions.

Natsuko TAKAMATSU

Abstract : Dendritic cells are known as potent antigen presenter to T cells and play important roles in the initiation of immune responses. When immature dendritic cells are exposed to antigens, they begin to mature by changing their expression of membrane molecules, *i.e.*, MHC class II, CD86, and CD83, and home to a regional lymph node to present the antigens to T cells. In dental pulp, dendritic cells are observed beneath the odontoblast layer. Immune system in pulp may start to work when these dendritic cells encounter antigens of microorganisms invading dentinal tubules. However, the priming potential of the bacteria in carious lesions on the maturation of dendritic cells is still unknown. Hence, we investigate the maturation of dendritic cells induced by the bacteria in carious lesions using a co-culture system. In this system, we selected 6 species of bacteria frequently detected in carious lesions. Dendritic cells derived from peripheral blood monocytes were co-cultured with these heat-killed bacteria. Bacteria in the carious lesion would be modified by serum components (immunoglobulins, complements) or a saliva component (sIgA). These modifications may influence the maturation process of pulp dendritic cells when these cells have been primed with those bacteria. Thus, we also investigate the influences of serum or saliva-treatment of the bacteria on the maturation of dendritic cells. When dendritic cells were co-cultured with *Streptococcus mutans*, their expression of MHC class II, CD86, and CD83 up-regulated with the increasing number of stimulating bacteria, and these stimulated dendritic cells produced IL-8 and IL-12 in dose-dependent manner. These facts indicated that dendritic cells matured by the stimulation of *S. mutans*. Maturation of dendritic cells was also induced by the other bacteria, *i.e.*, *S. sobrinus*, *S. sanguis*, *S. mitis*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus casei*; indicating maturation of dendritic cells occurred regardless of species of stimulating bacteria. When dendritic cells were co-cultured with serum-treated *S. mutans*, they showed higher expression of CD86 and CCR7, a chemokine receptor, and the production of IL-8 and IL-12; indicating their maturation was enhanced. On the other hand, dendritic cells co-cultured with saliva-treated *S. mutans* showed lower expression of CD86 and production of IL-12, which indicated the inhibition of dendritic cell maturation. In conclusion, the bacteria in carious lesion could induce maturation of pulp dendritic cells dose-dependently, and serum component could enhance the maturation of dendritic cells while saliva component would inhibit the maturation of them.

緒 言

歯髄炎は齲蝕などにより象牙質-歯髄複合体が侵害され免疫応答が順次惹起されて成立する炎症性疾患で、その発症および進行には生体の免疫機構が関与していると考えられている¹⁻⁶⁾。事実、初期の歯髄炎では、まず象牙芽細胞層下への樹状細胞 (dendritic cell : DC) の集積が認められ²⁾、そして、炎症の進行とともに、リンパ球を主体とする浸潤細胞の増加が示されている^{5, 6)}。樹状細胞は主要組織適合抗原複合体 (major histocompatibility complex : MHC) class II (HLA-DR) 陽性を示す樹状様細胞として組織学的に検出され、歯髄に広く分布しているが、正常歯髄ではとくに象牙芽細胞層や象牙前質に優位で、突起を象牙細管へと伸ばしていることが知られている⁷⁾。この事実、DCは歯髄炎の発症および歯髄の初期防御反応に重要な役割を果たしている可能性を示している。

成熟した DC は強力な抗原提示細胞 (antigen presenting cells : APC) で、獲得免疫の増強や抑制に重要な役割を担っている^{8, 9)}。多くの組織で DC は未成熟な状態で存在しており、局所で細菌刺激やサイトカインにより様々な過程を経て成熟する⁸⁾。この成熟過程において DC は、MHC class II や細胞接着/共刺激分子の CD80 と CD86、成熟化マーカーの CD83 を強く発現する¹⁰⁻¹²⁾。また、ヒト未成熟 DC はケモカイン受容体 CCR1 を発現しているが、成熟すると、CCR1 の発現が減少し CCR7 の発現が増加することが知られている¹³⁻¹⁶⁾。また成熟 DC はサイトカイン IL-12 やケモカイン IL-8 を産生し、種々の炎症性細胞との相互作用を行っていることが知られている¹⁷⁻¹⁹⁾。

末梢組織で成熟した DC は、所属リンパ節にホーミングし、強力な APC としてヘルパー T 細胞や細胞障害性 T 細胞の誘導に働くことが知られている^{8, 9)}。歯髄の DC においても、齲蝕細菌の刺激により成熟し、活性化や遊走化が起こると考えられるが、その詳細は不明である。

齲蝕は細菌感染による進行性の病変で、その原因菌としてミュータンスレンサ球菌が挙げられている²⁰⁻²²⁾が、エナメル質齲蝕が進行し、象牙質に達すると、細菌叢が多様化することが知られる^{23, 24)}。すなわち、初期エナメル質齲蝕では齲蝕病巣部に *Streptococcus mutans* が優位に認められるが^{20, 22)}、象牙質齲蝕においてはミュータンスレンサ球菌の他、*Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus casei* などが高頻度に検出される²⁵⁾。歯髄炎は、これら象牙細管への侵入度および侵入率の高い細菌によって惹起される可能性が高い。そこで、歯髄炎成立におけるこれらの細菌の役割、特に歯髄 DC の成熟への関与に興味を持たれる。しかしながら、実際齲蝕歯でどの細菌種が DC の成熟に関与しているかはまだ未だに明らかにされていない。

齲蝕病巣部では、象牙細管侵入細菌に対して、歯髄が活発に反応していると考えられる。事実、 γ -グロブ

リンや血清アルブミンなどの血清成分が齲蝕象牙質の歯髄側の半透明層に存在し²⁶⁾、深在性齲蝕において IgG, IgA, アルブミン, トランスフェリンなどの血清成分が細菌に感染した領域周辺を帯状に取り囲むように存在すること²⁷⁾が報告されている。これら免疫グロブリンや血清タンパクは象牙芽細胞により歯髄から象牙細管内へもたらされると考えられている²⁸⁾。また浅在性齲蝕において、細菌層の歯冠側に分泌型 IgA の唾液成分の存在が報告されている²⁷⁾。齲蝕病巣中に認められるこれらの血清成分や唾液成分は、象牙細管に侵入した細菌にオプソニン作用や抗菌作用などの影響を与え、DC の成熟を修飾している可能性がある。

そこで本研究では、ヒト末梢血より得た未成熟 DC を用いて齲蝕細菌の DC 成熟に及ぼす影響を検討するとともに、齲蝕細菌が DC を成熟させる過程において血清や唾液が及ぼす影響についても検討した。すなわち、ヒト末梢血単核球より分化させた未成熟 DC を異なる細菌数の *S. mutans* で刺激することにより、細菌数の差異による DC 成熟に及ぼす影響を検討し、さらに、齲蝕病巣で高頻度に検出される *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguis*, *S. mitis*, *A. viscosus*, *L. casei* を用いて、細菌種の差異による DC 成熟に及ぼす影響を検討した。また、細菌が DC を成熟させる過程において、血清および唾液が及ぼす影響を検討するために、*S. mutans* を血清または唾液で前処理した後、未成熟 DC と共培養を行い、DC の成熟を検討した。

実験材料と実験方法

1. ヒト末梢血からの単核球の分離

ヒト末梢血単核球 (Peripheral blood mononuclear cells : 以下 PBMC と略す) は Böyum の方法²⁹⁾ に準じた比重遠心法にて分離した。すなわち健康人より採血したヘパリン (ノボ・ノルディスク A/S, Denmark) 添加末梢血に等容量の Ca^{++} , Mg^{++} を含まないリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline (-) : 以下 PBS (-) と略す, pH7.0) を加え、この末梢血標品を 1 / 2 容量の比重分離液 (Histopaque R - 1077, Sigma, Germany) 上に重層し、室温で $400 \times g$ にて 30 分間遠心分離を行なった。比重遠心法により形成された PBMC 層を採取した後、これを PBS (-) にて 3 回遠心洗浄することにより PBMC 画分を得た。さらにこの画分を Monocyte Isolation Kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を用いた CD14 の magnetic cell sorting によるネガティブセレクションを行うことにより、単球を分離した。すなわち、PBMC を抗 CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123, Glycophorin A の各モノクローナル抗体にてラベルし、二次抗体として Micro Beads を結合させて、MACSTM Column に通し、ラベルされた細胞を Column に吸着させることによってラベルされていない細胞を回収した。得られた細胞を 10% 牛胎児血清を含む RPMI1640

培地 (Invitrogen Corporation, NY, USA) にて 1 時間培養し、プラスチック面に付着していない浮遊細胞を培養上清とともに除去した後、付着細胞を採取し単球として以後の実験に供した。なお、得られた単球画分にはフローサイトメトリー解析にて 95% 以上の CD14 陽性細胞が含まれていた。

2. ヒト未成熟 DC の誘導と成熟化刺激

未成熟 DC は Sallusto らの方法³⁰⁾ を用いて単球から誘導した。すなわち、上記のごとく調製した単球をリコンビナントヒト顆粒球・単球コロニー刺激因子 (granulocyte monocyto-colony stimulating factor: 以下 GM-CSF と略す) 500 U/ml (Pepro Tech, London, England) およびリコンビナントヒト IL-4 250 U/ml (Genzyme, Boston, MA, USA) を添加した 10% 牛胎児血清を含む RPMI1640 培地にて 4 日間培養を行うことにより、未成熟 DC を誘導した。得られた未成熟 DC は 20×10^4 /ml となるよう調製し、48 well plate (Corning Incorporated, NY, USA) に 500 μ l/well ずつ分注し、5 日間培養した後、細菌による刺激を開始した。

3. 供試菌株および培養方法

Streptococcus mutans MT8148 および *Streptococcus sobrinus* B13 は大嶋隆博士 (大阪大学大学院, 大阪) から、*Streptococcus sanguis* ST-3 は鳥居光男博士 (鹿児島大学大学院, 鹿児島) から、*Streptococcus mitis* TW185 は三宅洋一郎博士 (徳島大学大学院, 徳島) から、*Actinomyces viscosus* ATCC 19246 は木村重信博士 (岩手医科大学, 岩手) から、*Lactobacillus casei* ATCC4646 は福井公明博士 (徳島大学大学院, 徳島) から恵与された。*Streptococcus* 属の各菌株および *A. viscosus* は Brain heart infusion broth (Difco Laboratories, Detroit, USA, 以下 BHI broth と略す) にて、それぞれ 37℃, 24 時間培養した。*L. casei* は、*Lactobacilli* inoculum broth (日水製薬, 東京) で 37℃, 18 時間培養した。

4. 細菌および血清と唾液の調製

細菌は培養後、 $2,000 \times g$ で 10 分間遠心することにより集菌した後、RPMI1640 培地中に浮遊させ 100℃ で 45 分間煮沸することにより死菌化した。その後、再び RPMI 培地を加えて遠心にて 3 回洗浄した後、以下に示す調整を行った。すなわち、クリスタルバイオレットにて菌体を染色した後、血球計算盤を用いて光学顕微鏡下にて細菌数をカウントし、細菌数の調整を行った。

血清は、健康人より採取した血液を室温で 10 分間静置し凝固させた後、 $700 \times g$ で 15 分間遠心し、得られた上清を回収後、使用時まで -80℃ で保存した。

唾液は、健康人口腔より採取し、 $14,000 \times g$ で 5 分間遠心後、0.2 μ m ポアサイズのフィルターにてろ過滅菌し、すぐに以下の処理に使用した。

5. *S. mutans* の血清処理および唾液処理

死菌化した *S. mutans* に上記のごとく得られた血清あるいは唾液を加え 37℃, 60 分間培養した後、RPMI1640 培地にて 3 回洗浄を行い、未成熟 DC: *S. mutans* が 1: 10^4 となるよう細菌数を調整後、刺激した。なお、対照として、RPMI 1640 培地と共に 37℃, 60 分間培養した *S. mutans* を使用した。

6. total RNA 抽出と DNase 処理

Total RNA の抽出はフェノールとグアニジンイソチオシアネートを含む TRIzol Reagent (Invitrogen, CA, USA) を用い、Chomczynski らの方法³¹⁾ に準じて行った。すなわち、未成熟 DC および成熟 DC を 0.5 ml の TRIzol 中に室温で 5 分間反応させ、0.2 ml のクロロホルム (和光純薬, 大阪) を加え十分に攪拌後、さらに 3 分間反応させた。これを 15 分間遠心分離 (4℃, $12,000 \times g$) した後、RNA を含む水層を採取し、0.25 ml のイソプロパノール (和光純薬) を加え、室温で 10 分間反応させ、さらに同様の条件下で 10 分間遠心分離した。引き続き、上清を除去した後、1 ml の 80% エタノール (和光純薬) で洗浄し、再度遠心分離して得られた RNA の沈殿物を乾燥させた。得られた RNA を Distilled Water (以下、DW と略す) に溶解した後、DNase I (タカラバイオ, 滋賀) を用いそのプロトコールに従って DNase I 処理を行った。その後再度 DW に溶解し、cDNA の合成に用いた。

7. Complementary DNA (cDNA) 合成と遺伝子増幅、および NIH imaging による定量化

上記のごとく抽出した total RNA は、ThermoScript™ RT-PCR System (Invitrogen, CA, USA) と Oligo (dT)₂₀ (Invitrogen, CA, USA) を用い、そのプロトコールに従って cDNA の合成を行った。その後、TaKaRa Ex Taq™ Hot Start Version (タカラバイオ) を用い、そのプロトコールに従って遺伝子の増幅を行った。その際、表 1 に示す sense および antisense プライマーならびに TaKaRa PCR Thermal Cycler SP (タカラバイオ) を用い、至適条件のもとで反応・増幅させた。得られた PCR 産物を 1.5% アガロースゲル (タカラバイオ) を用いた電気泳動により分離し、ゲルを GelStar® Nucleic Acid Gel Stain (CamRex Bio Science Rockland, Inc., Rockland, ME, USA) にて染色し、UV トランスイルミネーター (コスモバイオ, 東京) を用いて検出した。

検出された mRNA 量は NIH Imaging 1.63 ソフトウェアプログラムによってゲルのデンシトメトリーを測定することで半定量化し、数値化した。値は control の GAPDH との比で表した。

8. フローサイトメトリー解析

成熟 DC 上における MHC class II, CD86 および CD83 の発現は、Fluorescein isothiocyanate (以下 FITC と略す)

表1 primer の塩基配列および PCR 条件

primer	塩基配列	アニーリング温度 (°C)	増幅産物 (bps)
CCR1-F	5'-GCAACTCCGTGCCAGAAGGTGA-3'	60	411
CCR1-R	5'-CCAAATGATGATGCTGGTGATGACACCA-3'		
CCR7-F	5'-TGCCATCTACAAGATGAGCT-3'	60	492
CCR7-R	5'-GGTGCTACTGGTGATGTTGA-3'		
IL-8-F	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGGCT-3'	60	294
IL-8-R	5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAAACCTCTC-3'		
GAPDH-F	5'-TGAAGTCGGAGTCAACGGATTGGT-3'	60	983
GAPDH-R	5'-CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC-3'		

で標識した抗ヒト MHC class II, 抗ヒト CD86マウスモノクローナル抗体 (PharMingen, San Diego, CA, USA) および抗ヒト CD83マウスモノクローナル抗体 (Beckman Coulter) を用いたフローサイトメトリーにて測定した。すなわち, 回収した細胞を0.2%牛血清アルブミン (Sigma) を含む PBS (-) 中に攪拌し, 各モノクローナル抗体を至適濃度に希釈し4℃で30分間反応させた。続いて, PBS (-) にて2回洗浄した後, 細胞自動解析装置 (EPICS XL-MCL; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) を用いて解析を行った。蛍光強度は, System II ソフトウェア (Beckman Coulter) を用いて Mean fluorescence intensity (MFI) および細胞陽性率として評価した。

9. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (以下 ELISA と略す)

DC 培養上清中の IL-8 および IL-12 は, 市販の ELISA kit Biosource International (Camarillo, CA, USA) を用いて測定した。

10. 統計分析

得られたデータは平均±標準偏差で表し, Student の t 検定を行って, $P < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. 齶蝕関連細菌による DC 成熟への影響

1) 細菌数による DC 成熟への影響

刺激する細菌数が DC の成熟化へどのように影響するかを検討するため, ヒト末梢血単球より誘導した5日目の未成熟 DC を, 異なる数の *S. mutans* 死菌体を用いて刺激した。DC が成熟すると, MHC class II, CD86, CD80 および CD83 が増強することが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。このため, 今回, MHC class II, CD86 および CD83 に着目し, 刺激48時間後の DC 表面の MHC class II, CD86 および CD83 発現をフローサイトメトリーにて検索した。その結果, *S. mutans* の菌数の増加に伴って, MHC class II, CD86 および CD83 の発現増加が認められた (図1)。とくに未成熟 DC と *S. mutans* とを $1:10^4$ で刺激した時, 発現が最大となった。

さらに, DC の成熟により産生が認められる IL-8 および IL-12 を今回 DC の成熟の指標として用い, 刺激24時間後の培養上清中の IL-8 および IL-12 タンパク量を測定した。その結果, 図2に示すように *S. mutans* で刺激した DC は, *S. mutans* の菌数の増加に伴い IL-8 および IL-12 の産生を増加した。とくに未成熟 DC 数と *S. mutans* 菌数の比が $1:10^3$, $1:10^4$ になるように刺激した時, DC による IL-8 および IL-12 の産生は有意に増加した ($P < 0.05$) (図2)。

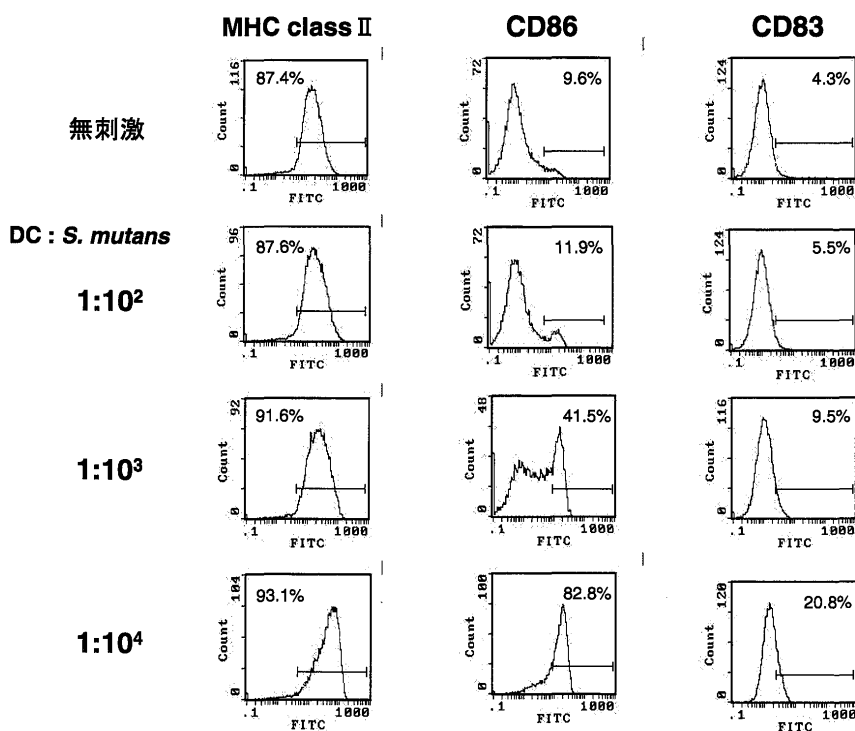


図1. *S. mutans* 菌体数の刺激が DC 表面の MHC class II, CD86 および CD83 発現に及ぼす影響

ヒト末梢血単球を GM-CSF および IL-4 存在下で5日間培養して誘導した未成熟 DC と *S. mutans* を, 未成熟 DC 数と *S. mutans* 菌体数の比が $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$ となるように共培養した。培養48時間後の DC を回収し, フローサイトメトリーにて細胞表面の MHC class II, CD86 および CD83 発現の解析を行った。

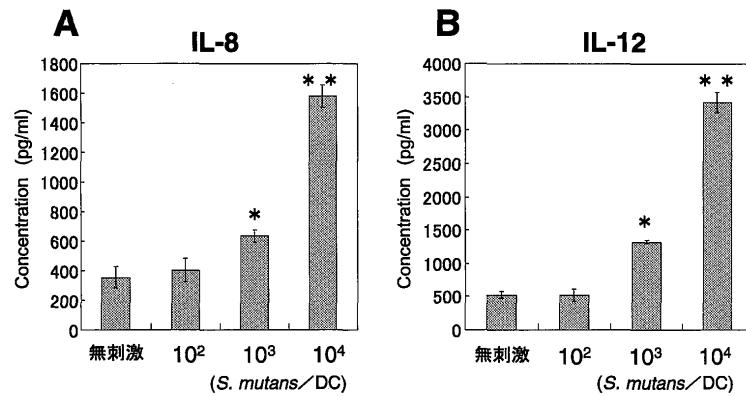


図2. *S. mutans* 菌体数の刺激がDCのIL-8およびIL-12産生に及ぼす影響

ヒト末梢血単球をGM-CSFおよびIL-4存在下で5日間培養して誘導した未成熟DCと*S. mutans*を、未成熟DC数と*S. mutans*菌体数の比が1:10², 1:10³, 1:10⁴となるよう共培養した。24時間後の培養上清を回収し、IL-8ならびにIL-12をELISAにて検出した。

*P<0.05 **P<0.01; 無刺激対照と比較して有意差を認めた。

2) 細菌種によるDC成熟への影響

齧蝕病巣中には異なる細菌種が存在しており、とくに齧蝕象牙質においては*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguis*, *S. mitis*, *A. viscosus*, *L. casei*の侵入率が高いことが報告されている²⁵⁾。そこでこの6菌種を用いて、刺激する細菌種がDC成熟へどのように影響するかを検討した。すなわちヒト末梢血単球より誘導した5日目の未成熟DCを、上記6種の細菌で刺激し、48時間後のDC表面のMHC class II, CD86およびCD83発現をフローサイトメトリーにて検索することによりDCの成熟を評価した。その結果、検討したすべての細菌種の刺激でMHC class II, CD86およびCD83の発現増加が認められた(図3)。*L. casei*刺激においてDC表面のMHC class IIおよびCD83の発現が最も増加したものの、細菌種による差異は認められなかった(図3 A, C)。

DCの成熟化に伴ってケモカイン受容体およびケモカインの発現が変化することが知られており、未成熟DCではCCR1が発現しているが、DCが成熟するに伴いCCR7およびIL-8が発現してくることが報告されている¹³⁻¹⁷⁾。そこで、この2つのケモカイン受容体およびケモカインを指標として、異なる細菌種がDCの成熟へどのように影響するかをmRNAレベルで検討した。その結果、今回検討したすべての細菌種において、DCのCCR1 mRNA発現は刺激12時間後に大きく減少し、その後48時間まで減少した(図4 A)。一方、DCのCCR7およびIL-8 mRNA発現は経過時間とともに増加した(図4 B, C)。なお、細菌種による差異は認められなかった(図4 A, B, C)。

さらに細菌6種で未成熟DCを刺激した時の培養上清中のIL-8およびIL-12量を検討した。その結果、培養上

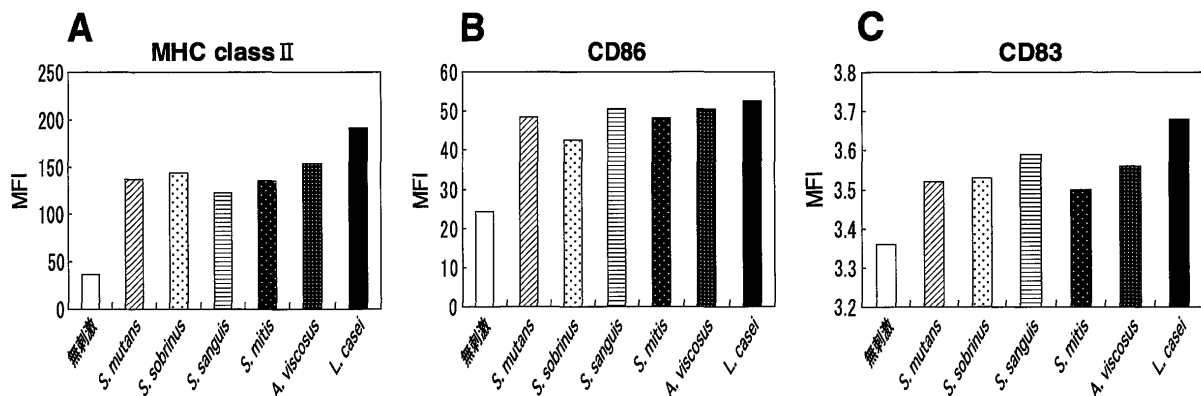


図3. 種々の齧蝕関連細菌刺激がDC表面のMHC class II, CD86およびCD83発現に及ぼす影響

ヒト末梢血単球をGM-CSFおよびIL-4存在下で5日間培養して誘導した未成熟DCを*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *A. viscosus*および*L. casei*と共培養した。培養48時間後、DCを回収し、DC表面のMHC class II, CD86およびCD83発現をフローサイトメトリーにより検索した。Mean fluorescence intensity (以下、MFIと略す)にて評価した結果を示す。

清中の IL-8 および IL-12 が増加し (図 5 A, B), 成熟 DC に分化していることが推測された。なお, 細菌種による有意差は認められなかった。

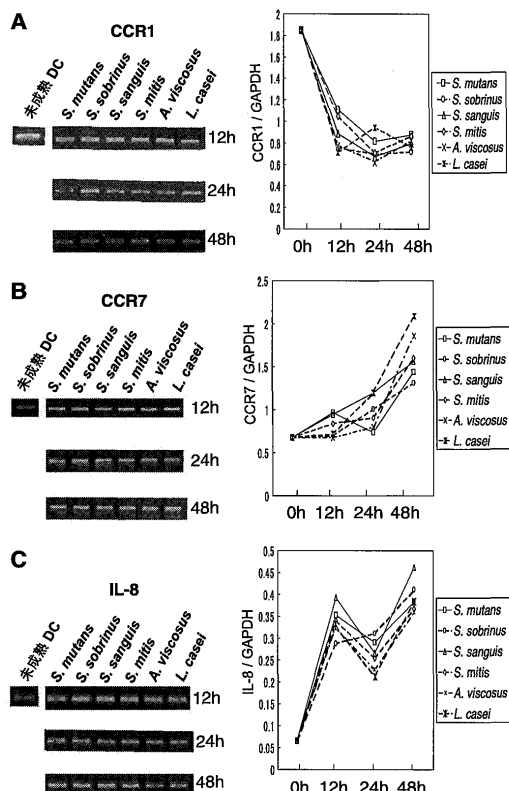


図 4. 種々の齲蝕関連細菌刺激が DC の CCR1, CCR7, および IL-8 の遺伝子発現に及ぼす影響
ヒト末梢血単球を GM-CSF および IL-4 存在下で 5 日間培養して誘導した未成熟 DC を *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *A. viscosus* および *L. casei* と共培養した。12 時間後, 24 時間後および 48 時間後, DC を回収し, total RNA を抽出後, CCR1 (A), CCR7 (B), および IL-8 (C) の遺伝子発現を RT-PCR により解析した。

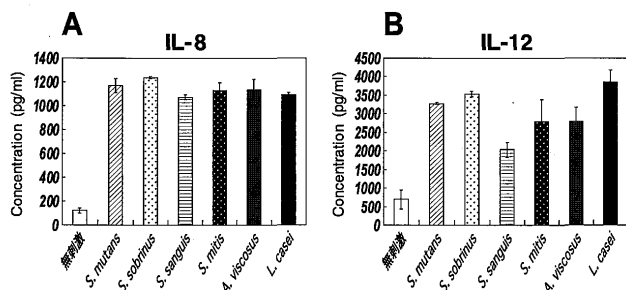


図 5. 種々の齲蝕関連細菌刺激が DC の IL-8 および IL-12 産生に及ぼす影響
ヒト末梢血単球を GM-CSF および IL-4 存在下で 5 日間培養して誘導した未成熟 DC を *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. mitis*, *S. sanguis*, *A. viscosus* および *L. casei* と共培養した。24 時間後, 培養上清を回収し, IL-8 (A) および IL-12 (B) を ELISA にて検出した。

2. *S. mutans* が DC を成熟させる過程において血清および唾液が及ぼす影響

1) 血清あるいは唾液で前処理した *S. mutans* 刺激による DC 表面の MHC class II, CD86 および CD83 発現
齲蝕病巣部においては, 歯質破壊の主な原因となる細菌とともに口腔からの唾液成分 (分泌型 IgA) や歯髄からの血清成分 (IgG, IgA, 補体, アルブミン) の存在が報告されている²⁶⁻²⁸⁾。そこで今回, 齲蝕関連細菌が DC を成熟させる過程において血清および唾液が及ぼす影響を検討するため, ヒト末梢血単球より誘導した 5 日目の未成熟 DC に血清あるいは唾液で前処理した *S. mutans* を用いて未成熟 DC を刺激し, 成熟を検討した。DC の成熟を評価するため, 刺激 48 時間後の DC 表面の MHC class II, CD86 および CD83 発現をフローサイトメトリーにて検索した。その結果を MFI で表し, 図 6 A に示す。未成熟 DC を血清で前処理した *S. mutans* で刺激した時, MHC class II および CD86 の増加が認められた (図 6 B)。一方, 未成熟 DC を唾液で前処理した *S. mutans* で刺激した時, 未処理対照に比べ, DC 表面の MHC class II および CD86 発現減少が認められた (図 6 C)。

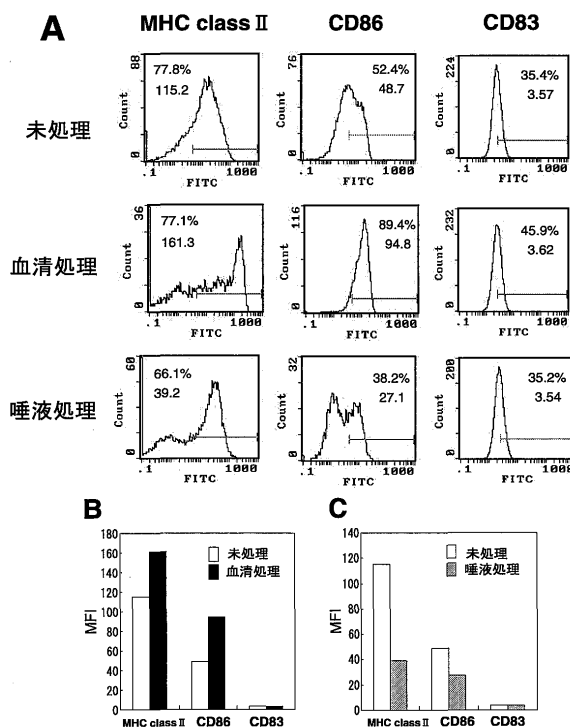
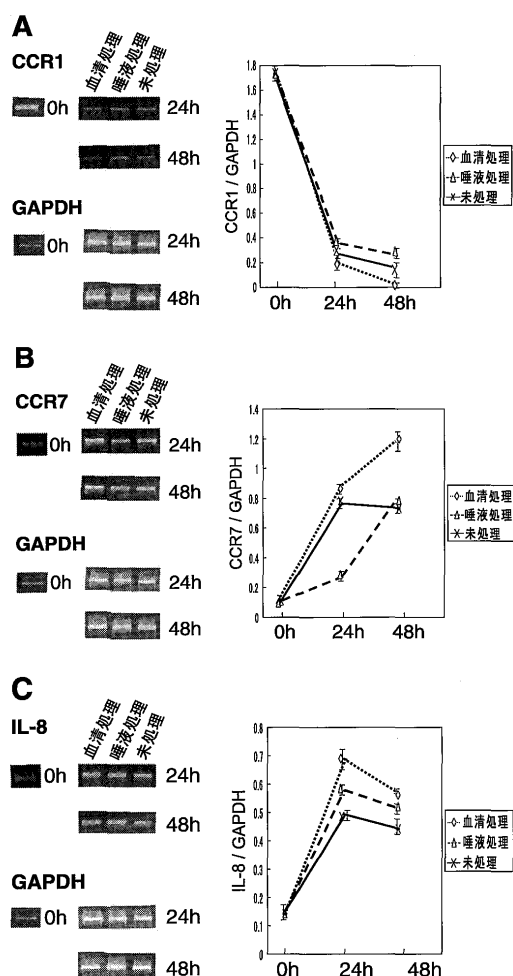


図 6. *S. mutans* の血清あるいは唾液処理が DC 表面の MHC class II, CD86 および CD83 発現に及ぼす影響
ヒト末梢血単球を GM-CSF および IL-4 存在下で 5 日間培養して誘導した未成熟 DC を血清あるいは唾液で前処理 (37°C, 60 min) した *S. mutans* と共培養した。48 時間培養後, DC を回収し, DC 表面の MHC class II, CD86 および CD83 発現をフローサイトメトリーにより検索した。上の数値は陽性細胞率を, 下の数値は MFI を示す。

2) 血清あるいは唾液で前処理した *S. mutans* 刺激による DC の CCR1, CCR7 および IL-8 遺伝子発現

次に, CCR1, CCR7 および IL-8 に着目して, 上記と同様に, 齧蝕関連細菌が DC を成熟させる過程において血清および唾液が及ぼす影響を mRNA レベルで検討し, DC の成熟を検討した。すなわち, ヒト末梢血単球より誘導した 5 日目の未成熟 DC を血清あるいは唾液で前処理した *S. mutans* で刺激し, 24 時間および 48 時間後の CCR1, CCR7 および IL-8 の mRNA 発現を検討した (図 7)。DC の CCR1 の mRNA 発現は, 未成熟 DC を血清で前処理した *S. mutans* で刺激した時, 未処理対照に比べ大きく減少し, 48 時間後にはほぼ 0 となった (図 7 A)。一方, 唾液で前処理した *S. mutans* で未成熟 DC を刺激した時は, 未処理対照に比べ DC の CCR1 mRNA 発現の減少が小さく認められ, 48 時間後では発現量が未処理対照の 1.5 倍程度であった (図 7 A)。DC の CCR7 mRNA 発現は, 48 時間後で, 血清で前処理した *S. mutans* で未成熟 DC を刺激した時, 未処理対照や唾液で前処理した *S. mutans* で未成熟 DC を刺激した時に比べ, 増加した (図 7 B)。また DC の IL-8 mRNA 発現は, 血清で前処理した *S. mutans* で未成熟 DC を刺激した時, 唾液で前処理した *S. mutans* で未成熟 DC を刺激した時, 未処理対照の順に, 高い値を示した (図 7 C)。



3) 血清あるいは唾液で前処理した *S. mutans* 刺激による DC の IL-8 および IL-12 産生

さらに, 齧蝕関連細菌が DC を成熟させる過程において血清および唾液が及ぼす影響を検討するため, 未成熟 DC を血清で前処理した *S. mutans* および唾液で前処理した *S. mutans* で刺激し, 24 時間後の培養上清中の IL-8 および IL-12 タンパク量を測定した。その結果を図 8 に示す。培養上清中の IL-8 は, 血清で前処理した *S. mutans* で未成熟 DC を刺激した時, 未処理対照に比べ有意に増加した (図 8 A)。また, 培養上清中の IL-12 についても, 同様に, 血清で前処理した *S. mutans* で未成熟 DC を刺激した時, 未処理対照に比べ有意な増加が認められた。一方, 唾液で前処理した *S. mutans* で未成熟 DC を刺激した時には, 未処理対照に比べ, 培養上清中の IL-12 の有意な減少が認められた (図 8 B)。

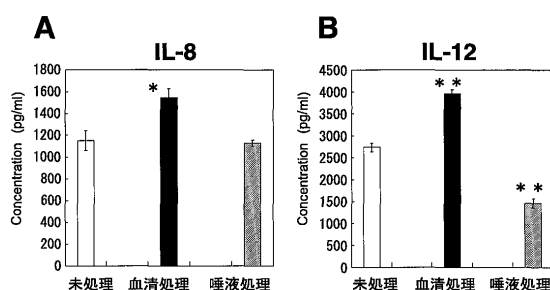


図 8. *S. mutans* の血清あるいは唾液処理が DC の IL-8 および IL-12 産生に及ぼす影響

ヒト末梢血単球を GM-CSF および IL-4 存在下で 5 日間培養して誘導した未成熟 DC を血清あるいは唾液で前処理 (37℃, 60 min) した *S. mutans* と共培養した。24 時間後, 培養上清を回収し, IL-8 および IL-12 を ELISA にて検出した。* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 未処理対照と比較して有意差を認めた。

図 7. *S. mutans* の血清あるいは唾液処理が DC の CCR1, CCR7 および IL-8 の遺伝子発現に及ぼす影響

ヒト末梢血単球を GM-CSF および IL-4 存在下で 5 日間培養して誘導した未成熟 DC を血清あるいは唾液で前処理 (37℃, 60 min) した *S. mutans* と共培養した。培養 24 時間後および 48 時間後の DC を回収し, total RNA を抽出後, CCR1 (A), CCR7 (B) および IL-8 (C) の遺伝子発現を RT-PCR により解析した。

考 察

近年、象牙質と歯髄は発生学的にも機能的にも相同な組織であるとの見地から、“象牙質－歯髄複合体”という概念での歯髄炎の動態研究が提唱されている³²⁾。この象牙質－歯髄複合体が、齲蝕などの細菌侵襲を受けた場合、象牙質病変部では歯髄由来の血清成分や口腔内由来の唾液成分が、細菌に対する防御を行う^{26, 27)}と同時に、病変部直下の歯髄組織では樹状細胞が集積し、細菌に対する免疫応答を行っている^{33, 34)}と推察されている。しかしながら、その詳細は不明であった。今回、*S. mutans*と未成熟DCとを共培養することにより、*S. mutans*がDCの成熟へ及ぼす影響を検討した。その結果、共培養したDCは成熟化マーカーのMHC class II, CD86, CD83の発現を増強した。さらにCCR1の発現の低下およびCCR7の発現増加を認め、DCの成熟化が示された。Corintiら³⁵⁾は*S. gordonii*が、またKranzerら³⁶⁾は*Helicobacter pylori*がDCを成熟化させることを報告しているが、今回、齲蝕関連細菌の*S. mutans*がDCの成熟化に関与し、CCR7の発現増加やIL-8, IL-12を産生させることが明らかとなった。このことは歯髄のDCが齲蝕による初期歯髄炎の病態形成に重要な役割を果たしていることを示している。CCR7の発現増加は、*S. mutans*刺激によって成熟したDCが歯髄組織から所属リンパ節にホーミングする可能性を示しており、さらに、*S. mutans*刺激により成熟したDCが好中球遊走因子であるIL-8や1型ヘルパーT細胞タイプのサイトカインであるIL-12を産生したことから、歯髄のDCは抗原提示を行うだけでなく、好中球やナイーブT細胞に対しても影響を与える可能性が示された。

齲蝕象牙質中には*S. mutans*の他、*S. sobrinus*, *S. sanguis*, *S. mitis*, *A. viscosus*, *L. casei*などが高頻度に認められている²⁵⁾。そこで、この6種の細菌を用いて同様にDCの成熟へ及ぼす影響を検討した。その結果、今回検討した6種の細菌すべてがDCの成熟に影響を与えることが明らかとなり、また、これらの細菌刺激によるDCの成熟は細菌数に依存することも明らかとなった。*S. gordonii*も細菌数の増加に伴ってDC表面のMHC class II, CD86, CD83発現が増加すること、またIL-8およびIL-12の産生が増加することが報告されている³⁵⁾。*H. pylori*も細菌数の増加に伴ってIL-8, IL-12の産生が増加することが報告されている。これらを総合すると、DCの成熟は細菌種には依存せず、細菌数が重要な因子であると考えられる。しかしながら、Veckmanらは未成熟DCを口腔内グラム陽性細菌*Streptococcus pyogenes*および*Lactobacillus rhamnosus*で刺激したところ、*S. pyogenes*の方が*L. rhamnosus*に比べDCの成熟が強いことを示し、細菌種によるDCの成熟の差異を報告している³⁷⁾。DCの成熟が細菌種に依存することを示すこれらの報告とDCの成熟が細菌種に依存しないことを示す本研究の結果とが相反した原因として、病原菌と常在菌の

差異が考えられる。*S. pyogenes*はレンサ球菌の中で最も病原性が強い細菌であることが知られている。一方、*L. rhamnosus*や今回刺激に用いた6種の齲蝕関連細菌は常在菌であることから、この差異がDCの成熟の強さを変化させた可能性がある。また、このほか刺激した細菌数の影響も考えられる。Veckmanらが未成熟DCに刺激した*S. pyogenes*や*L. rhamnosus*の菌数は今回検討した6種の細菌刺激で使った細菌数より少ない。これらを総合すると、齲蝕関連細菌においても、病原性の有無や細菌数の差異が歯髄のDCの成熟を調節することが考えられ、今後の検討課題となるだろう。

次に、DCの成熟に関与する細菌の共通成分に興味を持たれる。今回未成熟DCへの刺激に用いた細菌は死菌であることから、DCの成熟を促進した菌体成分として、グラム陽性菌の細胞壁を構成するペプチドグリカン（以下、PGNと略す）やリポタイコ酸（以下、LTAと略す）が考えられる。事実、MichelsenらはマウスにおいてPGNおよびLTAがDCの成熟を誘導することを示している³⁸⁾。PGNやLTAは細菌種により異なり、例えば、*Actinomyces*属のLTAは*Streptococcus*属の細胞壁に認められるLTAとは異なるという報告や、*Lactobacillus*群のPGNは構成するアミノ酸にリシンが多いことを示す報告がある³⁹⁾。しかしながら、異なる細菌種の菌体成分によりDCの成熟化を比較検討した報告はないため、今後の検討課題となろう。

齲蝕病巣部で認められる血清成分や唾液成分が、齲蝕細菌によるDCの成熟過程に及ぼす影響を検討した。その結果、血清成分は齲蝕細菌によるDCの成熟を促進し、唾液成分は齲蝕細菌によるDCの成熟を抑制した。一般に、細菌などの抗原が免疫グロブリン(IgG, IgM)や補体(とくにC3b)によりオプソニン作用を受けると、食細胞(マクロファージや好中球など)の貪食を亢進するといわれている^{40, 41)}。今回血清で前処理した*S. mutans*によりDCの成熟が促進したのは、このオプソニン作用の影響が考えられる。すなわち、未成熟DCは、オプソニン作用により抗原である*S. mutans*の取込みを促進し、その成熟が促進した可能性が考えられる。さらに、補体は免疫グロブリンに結合することでオプソニン作用を発揮することから、DCの成熟に補体も関与している可能性がある。事実、補体の活性をなくした非働化血清(56℃, 30min)で前処理した*S. mutans*を未成熟DCと共培養した結果、成熟の促進は認められなかった(data not shown)。このことから、血清で前処理した*S. mutans*刺激によりDCの成熟が促進した過程において、補体が重要な役割を果たしていると推察される。

一方、唾液で前処理した*S. mutans*で未成熟DCを刺激した結果、成熟が抑制された。本研究においては細菌を死菌化した後唾液での前処理を行っているため、細菌の菌体表面に作用し、その抗原性を減弱させる唾液成分が考えられる。唾液中にはリゾチーム、ラクトフェ

リン、ペルオキシダーゼや抗体 (分泌型 IgA) 等の抗菌因子が含まれていることが知られている。このうち、リゾチームは細胞壁 PGN の主要構成成分であるムラミン酸とグルコサミン間の β 1-4 結合を分解したり^{42, 43)}、また *S. mutans* MT8148 の表面蛋白抗原 PAc に結合することが報告されている⁴⁴⁾。これらの報告から、リゾチームは PGN に対する分解作用と PAc に結合しその抗原性をブロックする作用により、菌体表面の抗原性を減弱したと考えられる。さらに、分泌型 IgA は *S. mutans* 菌体表面の付着因子 Antigen I/II に結合することによって、その付着や集落化を抑制することが報告されており^{45, 46)}、DC が *S. mutans* を貪食する際、DC と *S. mutans* との付着を抑制した可能性が考えられ、今後の検討課題となろう。

未成熟 DC が成熟すると、ケモカイン IL-8 の産生を開始する^{16, 17)}。IL-8 は白血球の中でも、とくに好中球に対する遊走作用が強く、炎症初期における局所への好中球の浸潤に重要な役割を果たしていると考えられている。本研究では齧蝕関連細菌により成熟した DC が好中球に及ぼす影響を検討するため、DC が産生する IL-8 を遺伝子レベルおよびタンパクレベルで測定した。その結果、齧蝕関連細菌により成熟した DC は IL-8 を産生し、歯髄炎初期において、成熟した歯髄 DC が好中球の浸潤に関与する可能性が示された。さらに未成熟 DC を血清で前処理した *S. mutans* で刺激した結果、成熟の促進が認められ、上清中の IL-8 タンパク量が増加した。一方、唾液で前処理した *S. mutans* を未成熟 DC で刺激した結果、成熟の抑制が認められたにもかかわらず、培養上清中の IL-8 の減少は認められなかった。ヒト全唾液中には IL-8、CD14 およびアルブミンなどが含まれていることが報告されている⁴⁷⁻⁴⁹⁾。CD14 は、歯肉上皮細胞に作用し、IL-8 の産生を増加することが報告され⁴⁹⁾、また、アルブミンも尿細管上皮細胞から IL-8 を産生することが報告されている⁵⁰⁾。これらの報告から、今回唾液で前処理した *S. mutans* で刺激した DC の培養上清中に IL-8 産生の減少が認められなかったのは、唾液中の IL-8 の混入と、CD14 あるいはアルブミンにより DC の IL-8 産生が増加したことが推察される。しかしながら、今回唾液成分による DC の成熟や IL-8 産生は検討しておらず、今後の検討課題となろう。

本研究では、齧蝕象牙質に高頻度に認められる細菌を用い、歯髄の DC の成熟に与える影響を検討した。その結果、齧蝕関連細菌は DC の成熟を促進した。しかしながら、実際齧蝕による歯髄炎の発症には象牙質齧蝕の時から歯髄に何らかの変化が生じていることが報告され¹⁾、細菌が直接象牙質-歯髄複合体へ侵入しなくても、細菌が産生する酵素、有機酸、代謝産物などの可溶性刺激物質が象牙細管を介して歯髄の DC に到達し、影響を及ぼすことが考えられる。事実、*S. mutans* が産生する酵素である Glucosyltransferase が PBMC のサイトカイン

産生を誘導し、T 細胞を増殖させることが報告されている^{51, 52)}。このため、今後は齧蝕関連細菌の産生物質が歯髄の DC の成熟に与える影響を明らかにすることが重要と考えられる。

また、本研究では *in vitro* の実験系で現在一般的に行われている Sallusto らの方法³⁰⁾ を用い、ヒト末梢血単球から GM-CSF および IL-4 で誘導した未成熟 DC を使用した。この実験系により誘導される未成熟 DC は、CD14 陰性を示す。しかしながら、実際歯髄において認められている未成熟 DC には CD14 陰性を示す細胞の他に、CD14 陽性を示す細胞が認められることが報告されており⁵³⁾、歯髄には、今回用いられた DC とは異なる細胞型の DC が存在していることが考えられる。このため、別の細胞型の DC、すなわち CD14 陽性を示す未成熟 DC においても同様に検討する必要がある。

結 論

本研究では、ヒト末梢血より得た未成熟 DC を用いて齧蝕病巣で高頻度に検出される細菌が歯髄の DC の成熟を促し得るか否かを検討するとともに、齧蝕関連細菌が DC を成熟させる過程において血清や唾液が及ぼす影響についても検討し、*in vitro* の実験系にて以下の結果を得た。

1. 未成熟 DC を齧蝕関連細菌で刺激することにより、DC の CCR1 の減少、CCR7 の増加および IL-8 の増加を mRNA レベルで、また DC 表面の成熟化マーカー MHC class II、CD86 および CD83 の発現増強を認め、DC の成熟化が認められた。
2. 齧蝕関連細菌で未成熟 DC を刺激後、成熟した DC は IL-8 および IL-12 を産生した。
3. DC の成熟は、細菌種には影響を受けず、細菌数に影響を受けることが示された。
4. 未成熟 DC は血清と反応させた *S. mutans* により成熟を促進し、唾液と反応させた *S. mutans* により成熟を抑制した。

以上の結果より、齧蝕歯において、齧蝕関連細菌が歯髄の DC の成熟を促進する可能性が示されるとともに、DC の成熟は細菌種に依存せず、細菌数に依存することが明らかとなった。また、唾液あるいは血清による細菌の前処理で DC の成熟が相反したことから、象牙細管内の唾液や血清成分が異なる場合、すなわち細菌の侵入程度や侵入速度により、歯髄の初期免疫反応が変化する可能性が示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜った歯科保存学分野 松尾敬志教授に深甚なる謝辞を表しますとともに、御校閲、御助言を戴いた口腔感染症学分野 三宅洋一郎教授、小児口腔健康科学分野 西野瑞穂教授に深謝致します。また、直接御指導と御助言を戴いた歯

科保存学分野 中江英明助教授, 尾崎和美講師に厚く御礼申し上げます。最後に数々の御教示と御援助を戴いた歯科保存学分野の諸先生方に深謝致します。

参考文献

- 1) Hahn CL, Best AM and Tew JG: Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. *Infect Immun* 68, 6785-6789 (2000)
- 2) Sakurai K, Okiji T and Suda H: Co-increase of nerve fibers and HLA-DR- and/or factor-XIIIa-expressing dendritic cells in dentinal caries-affected regions of the human dental pulp; an immunohistochemical study. *J Dent Res* 78, 1596-1608 (1999)
- 3) Martin FE, Nadkarni MA, Jacques NA and Hunter N: Quantitative microbiological study of human carious dentin by culture and real-time PCR: Association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol* 40, 1698-1704 (2002)
- 4) Reeves R and Stanley HR: The relationship of bacterial penetration and pulpal pathosis in carious teeth. *Oral Surg* 22, 59-65 (1966)
- 5) Izumi T, Kobayashi I, Okamura K and Sakai H: Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth. *Archs Oral Biol* 40, 609-614 (1995)
- 6) Hahn CL, Falkler WA and Siegel MA: A study of T and B cells in pulpal pathosis. *J Endod* 15, 20-26 (1989)
- 7) Ohshima H, Maeda T and Takano Y: The distribution and ultrastructure of class II MHC-positive cells in human dental pulp. *Cell Tissue Res* 295, 151-158 (1999)
- 8) Banchereau J, Steinman R M: Dendritic cell and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252 (1998)
- 9) Pierre G, Jenny V, Laurence Z, Clotilde T and Sebastian A: Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 20, 621-667 (2002)
- 10) Brooks C F and Moore M: Differential MHC class II expression on human peripheral blood monocytes and dendritic cells. *Immunology* 63, 303-311 (1988)
- 11) McLellan A D, Starling G C, Williams L A, Hock B D and Hart D N: Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur J Immunol* 25, 2064-2068 (1995)
- 12) Lechmann M, Krooshoop D J E B, Dudziak D, Kremmer E and Steinkasserer A: The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J Exp Med* 194, 1813-1821 (2001)
- 13) Dieu, M C, Vanbervliet B, Vicari A, et al.: Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 188, 373-386 (1998)
- 14) Silvano S, Paola A, Amico G D, Walter L, Giancarlo B and Motoji K: Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: A model for their trafficking properties. *J Immunol* 161, 1083-1086 (1998)
- 15) Federica S, Patrick S, Pius L, Christoph S, Danielle L and Antonio L: Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Euro J Immunol* 28, 2760-2769 (1998)
- 16) Federica S, Belinda P, Danielle L, Minja M, Sampsa M and Antonio L: Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 29, 1617-1625 (1999)
- 17) Zhl K, Shen Q, Mrowietz U and Zheng M: Human monocyte-derived dendritic cells expressing both chemotactic cytokines IL-8, MCP-1, RANTES and their receptors, and their selective migration to these chemokines. *Chinese Med J* 113, 1124-1128 (2000)
- 18) Lore K, Sonnerborg A, Spetz AL, Andersson U and Andersson J: Immunocytochemical detection of cytokines and chemokines in Langerhans cells and in vitro derived dendritic cells. *J Immunol Methods* 214, 97-111 (1998)
- 19) Verhasselt V, Buelens C, Willems F, De Groote D, Haeflner-Cavaillon N and Goldman M: Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *J Immunol* 158, 2919-2925 (1997)
- 20) Loesche W J: Role of *Streptococcus mutans* in human dentinal decay. *Microbiol Rev* 50, 353-380 (1986)
- 21) Milnes A R and Bowden G H W: The microflora associated with developing lesions of nursing caries. *Caries Res* 19, 289-297 (1985)
- 22) Hamada S and Slade H D: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 44, 331-384 (1980)
- 23) Edwardsson S: Bacteriological studies on deep areas of carious dentin. *Odont Revy* 25 Suppl 32, 1-143 (1974)
- 24) Hosino E: Predominant obligate anaerobes in human carious dentin. *J Dent Res* 64, 1195-1198 (1985)
- 25) Ozaki K, Matsuo T, Nakae H, Noiri Y, Yosiyaama M and Ebisu S: A quantitative comparison of selected bacteria in human carious dentine by microscopic counts. *Caries Res* 28, 137-145 (1994)
- 26) Sumitani M, Takeuchi T, Shimahara T, Tsubakimoto K and Tsutsui M: Salivary, serum, and microbial components of human carious dentin. *J Dent Res* 51,

- 1067-1070 (1972)
- 27) Okamura K, Tsubakimoto K, Uobe K, Nishida K and Tsutsui M: Serum protein and secretory component in human carious dentin. *J Dent Res* 58, 1127-1133 (1979)
- 28) Okamura K, Maeda M, Nishikawa T and Tsutsui M: Dentinal response against carious invasion: Localization of antibodies in odontoblastic body and process. *J Dent Res* 59, 1368-1373 (1980)
- 29) Böyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97, 77-89 (1968)
- 30) Sallusto F and Lanzavecchia A: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118 (1994)
- 31) Chomczynski P: A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques* 15, 532-534, 536-537 (1993)
- 32) Love R M and Jenkinson H F: Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 13, 171-183 (2002)
- 33) Jontell M, Okiji T, Dahlgren U and Bergenholtz G: Immune defence mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med* 9, 179-200 (1998)
- 34) Kamal AM, Okiji T, Kawasima N and Suda H: Defense responses of dentin/pulp complex to experimentally induced caries in rat molars: an immunohistochemical study on kinetics of pulpal Ia antigen-expressing cells and macrophages. *J Endod* 23, 115-120 (1997)
- 35) Corinti S, Medaglini D, Cavani A, Rescigno M, Pozzi G, Ricciardi Castagnoli P, Girolomoni G: Human dendritic cells very efficiently present a heterologous antigen expressed on the surface of recombinant gram-positive bacteria to CD4⁺ T lymphocytes. *J Immunol* 163, 3029-3036 (1999)
- 36) Kranzer K, Eckhardt A, Aigner M, Knoll G, Deml L, Speth C, Lehn N, Rehli M and Schneider-Brachert W: Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 72, 4416-4423 (2004)
- 37) Veckman V, Miettinen M, Pirhonen J, Siren J, Matikainen S and Julkunen I: *Streptococcus pyogenes* and *Lactobacillus rhamnosus* differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocyte-derived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 75, 764-771 (2004)
- 38) Michelsen KS, Aicher A, Mohaupt M, Hartung T, Dimmeler S, Kirschning CJ and Schumann RR: The role of toll-like receptors (TLRs) in bacteria-induced maturation of murine dendritic cells (DCs). Peptidoglycan and lipoteichoic acid are inducers of DC maturation and require TLR2. *J Biol Chem* 276, 25680-25686 (2001)
- 39) 高添一郎: “乳酸桿菌”. 歯学微生物学 (第5版). 東京, 医歯薬出版株式会社, (1992), 264-265, 270-271
- 40) Fries L F, Siwik S A, Malbran A and Frank M M: Phagocytosis of target particles bearing C3b-IgG covalent complexes by human monocytes and polymorphonuclear leucocyte. *Immunology*, 62, 45-51 (1987)
- 41) Schorlemmer HU, Hofstaetter T and Seiler FR: Phagocytosis of immune complexes by human neutrophils and monocytes: relative importance of Fc and C3b receptors. *Behring Inst Mitt* 76, 88-97 (1984)
- 42) Formanek H: A three dimensional model of the digestion of peptidoglycan by lysozyme. *Biophys Struct Mech* 4, 1-14 (1977)
- 43) Phillips DC: The three-dimensional structure of an enzyme molecule. *Sci Am* 215, 78-90 (1966)
- 44) Senpuku H, Kato H, Todoroki M, Hanada N and Nishizawa T: Interaction of lysozyme with a surface protein antigen of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett* 139, 195-201 (1996)
- 45) Wallengren ML, Hamberg K and Ericson D: Salivary IgA reactions to cell-surface antigens of oral *streptococci*. *Oral Microbiol Immunol* 19, 188-195 (2004)
- 46) Luo ZL: The effect of antibody to *Streptococcus mutans* in saliva on caries activity and *S. mutans* adhering. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 28, 164-169 (1993)
- 47) Winkler O, Handnagel W and Idel H: Cytokines detectable in saliva of children as appropriate markers of local immunity of the oral cavity- an approach for the use in air pollution studies. *Int J Hyg Environ Health* 204, 181-184 (2001)
- 48) Ruhl S, Hamberger S, Betz R, Sukkar T, Schmalz G, Seymour RA, Hiller KA and Thomason JM: Salivary proteins and cytokines in drug-induced gingival overgrowth. *J Dent Res* 83, 322-326 (2004)
- 49) Takayama A, Satoh A, Ngai T, Nishimura T, Ikawa K, Matsuyama T, Shimauchi H and Sugawara S: Augmentation of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* invasion of human oral epithelial cells and up-regulation of interleukin-8 production by saliva CD14. *Infect Immun* 71, 5598-5604 (2003)
- 50) Tang S, Leung JC, Abe K, Chan KW, Chan LY, Chan TM

- and Lai KN: Albumin stimulates interleukin-8 expression in proximal tubular epithelial cells in vitro and in vivo. *J Clin Invest* 111, 515-527 (2003)
- 51) Jean S C, Huei T L, Po R H, Pei M C, Andy S and Jen Y C: Induction of cytokines by glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. *Clin Diagn Lab Immunol* 9, 892-897 (2002)
- 52) Jean S C, Chiou M Y, Chung Y H, Bor L C and Jen Y C: Human T-cell response to the glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 441-445 (2001)
- 53) Okiji T, Jontell M, Belichenko P, Bergenholtz G and Dahlstrom A: Perivascular dendritic cells of the human dental pulp. *Acta Physiol Scand* 159, 163-169 (1997)